

---

1 / 1 WPAT - ©Thomson Derwent

**Accession Nbr :**

1992-331731 [40]

**Sec. Acc. CPI :**

C1992-147530

**Sec. Acc. Non-CPI :**

N1992-253345

**Title :**

New DNA encoding oxalate oxidase - for transforming plants to protect them against Sclerotinia infection

**Derwent Classes :**

C06 D16 P13

**Patent Assignee :**

(RHON ) RHONE-POULENC AGROCHIMIE  
(RHOD ) RHODIA AGRO LTDA  
(RHON ) RHONE-POULENC AGROCHIMIE  
(RHON ) RHOBIO  
(AVET ) AVENTIS CROPS SCIENCE SA

**Inventor(s) :**

FREYSSINET G; SAILLAND A; SAILAND A

**Nbr of Patents :**

20

**Nbr of Countries :**

35

**Patent Number :**

WO9215685 A1 19920917 DW1992-40 C12N-015/53 Fre 23p \*  
AP: 1992WO-FR00195 19920304  
DSNW: AU BG BR CA CS HU JP KR PL RO RU US  
DSRW: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU MC NL SE

FR2673644 A1 19920911 DW1992-45 C12N-015/53 9p  
AP: 1991FR-0002874 19910305

AU9216820 A 19921006 DW1993-01 C12N-015/53  
FD: Based on WO9215685  
AP: 1992AU-0016820 19920304; 1992WO-FR00195 19920304

ZA9201647 A 19921125 DW1993-02 C12N-000/00 18p  
AP: 1992ZA-0001647 19920305

EP-531498 A1 19930317 DW1993-11 C12N-015/53 Fre 23p  
FD: Based on WO9215685  
AP: 1992EP-0908073 19920304; 1992WO-FR00195 19920304


**BEST AVAILABLE COPY**


**This Page Blank (uspto)**

DSR: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

CN1065683 A 19921028 DW1993-28 C12N-015/53  
AP: 1992CN-0101989 19920228

BR9204788 A 19930727 DW1993-34 C12N-015/53  
FD: Based on WO9215685  
AP: 1992BR-0004788 19920304; 1992WO-FR00195 19920304


PT-100203 A 19930730 DW1993-34 C12N-015/00  
AP: 1992PT-0100203 19920305


JP05506582 W 19930930 DW1993-44 C12N-015/53 7p  
FD: Based on WO9215685  
AP: 1992JP-0507499 19920304; 1992WO-FR00195 19920304


CZ9203369 A3 19940119 DW1994-10 C12N-015/53  
AP: 1992CS-0003369 19920304

NZ-241829 A 19940427 DW1994-20 C12N-015/53  
AP: 1992NZ-0241829 19920304

HUT065677 T 19940728 DW1994-31 C12N-015/53  
FD: Based on WO9215685  
AP: 1992HU-0003473 19920304; 1992WO-FR00195 19920304

AU-660976 B 19950713 DW1995-35 C12N-015/53  
FD: Previous Publ. AU9216820; Based on WO9215685  
AP: 1992AU-0016820 19920304

US6229065 B1 20010508 DW2001-28 C12N-015/82  
AP: 1992US-0941135 19920304; 1992WO-FR00195 19920304; 1994US-0207105  
19940308; 1995US-0400006 19950306

US6235530 B1 20010522 DW2001-30 A01H-005/00  
AP: 1992US-0941135 19920304; 1992WO-FR00195 19920304; 1994US-0207105  
19940308; 1995US-0400006 19950306; 1995US-0447703 19950523

CZ-289623 B6 20020313 DW2002-23 C12N-015/53  
FD: Previous Publ. CZ9203369; Based on WO9215685  
AP: 1992CS-0003369 19920304; 1992WO-FR00195 19920304

PH1199244002 B1 20010904 DW2003-57 C12N-015/53  
AP: 1992PH-0044002 19920304

MX-207871 B 20020522 DW2003-65 A01H-005/00  
AP: 1992MX-0000917 19920303

CN1051576 C 20000419 DW2004-67 C12N-015/82  
AP: 1992CN-0101989 19920228

**This Page Blank (uspto)**

IL-101117 A 20040927 DW2004-78 C12N-015/53

AP: 1992IL-0101117 19920302

**Priority Details :**

1991FR-0002874 19910305

**Citations :**

WO8808450;

4.Jnl.Ref

**IPC s :**

A01N-063/00 A01H-005/00 C12N-000/00 C12N-015/00 C12N-015/53 C12N-015/82 A01H-001/00 C12N-005/04 C12N-005/10 C12N-005/14 C12N-009/02 C12N-015/10 C12N-015/29 C12N-015/62

**Abstract :**

WO9215685 A

New DNA (I) encodes an oxalate oxidase (II) which can be used to render plants resistant to diseases caused by Sclerotinia spp.

Also new are (1) (II) itself; (2) chimaeric genes (III) which include (I); (3) plant-transformation vectors contg. (III); (4) transformed plant cells contg. such vectors and (5) transformed plants (esp. dicotyledons) derived from such cells.

USE/ADVANTAGE - By destroying oxalic acid (which is produced by S. sclerotiorum), (II) prevents a marked fall in intracellular pH and so makes the cell-wall lytic enzymes produced by the fungus less active. This slows down (or even inhibits) fungal growth. Specifically the method is applied to rape plants(Dwg.0/1)

**Manual Codes :**

CPI: C04-A07D5 C04-B02C2 C04-B04A1 C04-B04A4 C12-A02C D05-C03B D05-H03B D05-H12

**Update Basic :**

1992-40

**Update Equivalentents :**

1992-45; 1993-01; 1993-02; 1993-11; 1993-28; 1993-34; 1993-44; 1994-10; 1994-20; 1994-31; 1995-35; 2001-28; 2001-30; 2002-23; 2003-57; 2003-65; 2004-67; 2004-78

**Update Equivalentents (Monthly) :**

2001-05; 2001-06; 2002-04; 2003-09; 2003-10; 2004-10; 2004-12

Search statement 2

**This Page Blank (uspto)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> C12N 15/53, 9/02, 15/82 C12N 5/10, A01H 5/00 // A01N 63/00	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> WO 92/15685 <b>(43) Date de publication internationale:</b> 17 septembre 1992 (17.09.92)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR92/00195 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 4 mars 1992 (04.03.92)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 91/02874 5 mars 1991 (05.03.91) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 St-Cyr- au-Mont-d'Or (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; Le Pegase, 38, rue Albert-Chalinel, F-69009 Lyon (FR).		<b>(74) Mandataire:</b> CHRETIAN, François; Rhône Poulenc Agrochimie, DPI, 14, 20 rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), AU, BE (brevet euro- péen), BG, BR, CA, CH (brevet européen), CS, DE (bre- vet européen), DK (brevet européen), ES (brevet euro- péen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), PL, RO, RU, SE (brevet européen), US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avec revendications modifiées.</i>
<b>(54) Title:</b> PRODUCTION OF PLANTS RESISTANT TO ATTACKS OF SCLEROTINIA SCLEROTIORUM BY INTRO- DUCING A GENE CODING FOR AN OXALATE OXIDASE  <b>(54) Titre:</b> PRODUCTION DE PLANTES RESISTANTES AUX ATTAQUES DE SCLEROTINIA SCLEROTIORUM PAR INTRODUCTION D'UN GENE CODANT POUR UNE OXALATE OXYDASE  <b>(57) Abstract</b>  A DNA sequence coding for an oxalate oxidase. The protein is useful in making plants resistant to diseases caused by Sclerotinia sp. It may be provided by a chimeric gene and a vector containing the coding sequence. It is useful in increasing the resistance of plants to diseases due to Sclerotinia sp.  <b>(57) Abrégé</b>  Séquence ADN codant pour une oxalate oxydase. La protéine est utilisable pour la résistance des plantes aux maladies provoquées par sclerotinia sp. Elle peut être apportée par un gène chimérique et un vecteur contenant la séquence codante. Elle est utilisable pour apporter aux plantes une résistance accrue aux maladies dues à Sclerotinia sp.		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	B Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				



PRODUCTION DE PLANTES RESISTANTES  
AUX ATTAQUES DE SCLEROTINIA SCLEROTIUM  
PAR INTRODUCTION D'UN GENE CODANT  
POUR UNE OXALATE OXYDASE

5

10           La présente invention a pour objet un gène codant pour une oxalate oxydase, la protéine codée par ce gène, les gènes chimères comprenant ce gène et leur utilisation pour la transformation en vue de leur conférer une résistance à des maladies fongiques.

15           La Sclerotiniose est une maladie fongique importante qui touche un grand nombre de dicotylédones. Le responsable, Sclerotinia sclerotiorum est un champignon polyphage qui présente peu de spécificité d'hôte.

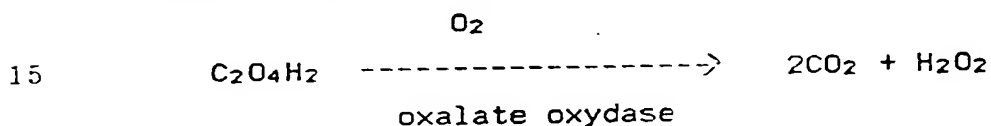
20           Le champignon peut attaquer la plante soit directement au niveau de la tige, soit au niveau des feuilles puis gagner la tige, soit au niveau du capitule floral. Dans les deux premiers cas, la plante fane par rupture d'alimentation. Dans le dernier cas,  
25           la fleur fane compromettant la récolte.

          Le champignon produit des enzymes lytiques qui dégradent la paroi cellulaire du végétal infecté et facilitent son développement dans la plante. Ces enzymes jouent un rôle important dans la pathogénicité,  
30           mais ne semblent pas suffisantes. Ce champignon produit aussi de l'acide oxalique (Godov et al., 1990). Cet acide oxalique provoque une baisse de pH dans les tissus infectés facilitant l'hydrolyse de la paroi cellulaire par les enzymes lytiques. Une réduction de

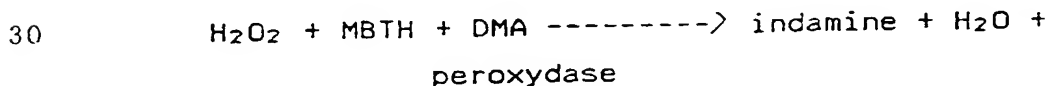
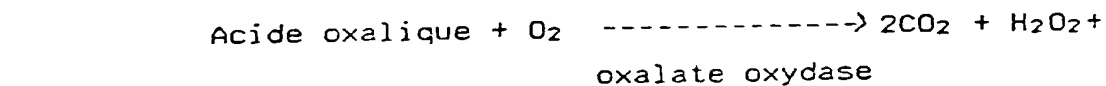
la production d'acide oxalique ou une dégradation de cet acide oxalique doit permettre un ralentissement ou même une inhibition du développement du champignon.

Pour développer une plante résistante à "nos", on peut utiliser la stratégie de détoxication de l'acide oxalique. La dégradation de cet acide limitera les diminution du pH intracellulaire du tissu végétal attaqué, les enzymes lytiques fonctionneront alors trop loin de leur pH optimum pour être réellement actives et efficaces. Il en résultera une baisse de la pathogénicité du champignon.

Pour atteindre cet objectif, on peut utiliser l'oxalate oxydase qui catalyse la réaction suivante :



L'oxalate oxydase est isolée de plantes différentes, généralement des monocotylédones (Pieta et al., 1982): on peut, par exemple purifier la protéine d'orge en utilisant des techniques de chromatographie classique (gels de filtration Superdex G75 et d'échange d'ions MonoQ, Pharmacia), en suivant l'activité enzymatique selon le protocole colorimétrique suivant (Obzansky et Richardson, 1983) :



MBTH = 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone

DMA = N,N,dimethylalinine

Ceci a permis de purifier une protéine qui, sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, a une masse moléculaire de 26 000 daltons. Une partie de l'oxalate oxydase purifiée a été utilisée pour obtenir des anticorps antioxalate oxydase de lapin ; le reste de la protéine a été utilisé pour faire le séquençage de la protéine native (N-terminal) ou, après clivage au bromure de cyanogène, le séquençage de certains peptides internes. Les résultats obtenus sont les suivants :

N-terminal : TDPDPLQDF-VADLDGKAVSVNGH  
S

Peptide interne n° 2 : HFQFNVGKTEAY

L'ADNc

La comparaison des séquences peptidiques décrites ci-dessus avec les données contenues dans la banque protéique Swiss-Prot nous a permis d'identifier une protéine de blé appelée Germin et publiée en 1989 par Dratewka-kos et al. Des expériences ont été réalisées et nous ont permis de déterminer que l'ADNc publié par les auteurs code pour une protéine de 201 acides aminés et qui présente une activité oxalate oxydase. Pour la suite de la description des expériences présentées dans ce brevet nous reprendrons la numérotation des nucléotides de la figure 2 de l'article des auteurs publiés dans J. Biol. Chem., 264, 4896-4900.

La séquence de cet ADNc a une longueur de 1 075 nucléotides avec un 5' non traduit de 85 résidus, une phase de lecture ouverte de 672 nucléotides (de la position 86 à 757) puis un 3' non traduit de 318 résidus.

La comparaison de la séquence protéique déduite de la séquence de l'ADNc avec celle obtenue par séquençage de la protéine native montre que l'ADNc code non seulement pour l'oxalate oxydase mature mais aussi pour un peptide signal de 23 acides aminés dans la partie N-terminale. L'oxalate oxydase est donc synthétisée sous forme d'une préprotéine (peptide signal plus peptide mature) qui est maturée par élimination du peptide signal pour libérer l'enzyme active mature.

10 Pour la suite nous utiliserons soit la partie codant pour la préprotéine (nucléotides 86 à 757), soit seulement la partie codant pour la protéine mature (de la position 155 à 757). Dans ce dernier cas, nous devons placer un codon AUG (codant pour une méthionine) devant le codon ACC (codant pour la thréonine, premier acide aminé de la protéine mature).

15 Les attaques de plantes par Sclerotinia slerotiorum se faisant essentiellement par la tige ou par la plante, il est intéressant de pouvoir exprimer l'oxalate oxydase soit dans les tissus chlorophylliens et pour cela on peut utiliser le promoteur de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase d'*Helianthus annuus* (PSUHa, Waksman et al., 1987) soit dans différents tissus du végétal et pour cela nous

20 utiliserons le promoteur ubiquitaire de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S) dont une partie a été dupliquée et qui est nommée "double CaMV"

25 Les gènes chimères selon l'invention peuvent être par exemple construits à partir des éléments suivants:

30 A. Promoteur double CaMV suivi de la partie de l'ADNc de l'oxalate oxydase codant pour la préprotéine (peptide signal plus peptide mature) et du terminateur "nos" obtenu à partir du gène

de la nopaline synthase de pTi 37(Bevan et al., 1983).

B. Promoteur double CaMV suivi de la partie de l'ADNc de l'oxalate oxydase codant seulement pour la protéine mature suivi du terminateur "nos".

C. Gène identique à "A" mais avec le promoteur de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase de tournesol (PSUHa) à la place du double CaMV.

D. Gène identique à "B" mais avec le promoteur de la PSUHa à la place du double CaMV.

Chaque gène chimère est introduit dans la cellule végétale par un système utilisant Agrobacterium ou tout autre système connu par ailleurs pour transformer les cellules végétales. Des plantes sont régénérées à partir de ces cellules transformées. Elles présentent une tolérance accrue au Sclerotinia sclerotiorum.

EXEMPLE 1 : Préparation de deux séquences codantes:

Préprotéine : on l'obtient à partir de l'ADNc décrit précédemment digéré par Hind III (en position 66). L'extrémité cohésive obtenue est rendue franche par traitement à la polymérase de Klenow. Cet ADN est ensuite digéré par Nhe I (en position 811).

Parallèlement le plasmide pUC 19 (Yanisch-Perron et al., 1985) est digéré par Sac I.

L'extrémité cohésive obtenue est rendue franche par traitement à la polymérase de Klenow. Ensuite le Plasmide est digéré par Xba I (compatible avec Nhe I).

Le fragment d'ADNc et le plasmide préparés ci-dessus sont ligaturés. Le nouveau plasmide ainsi obtenu est dénommé pRPA-oxo-01 et sa carte est présentée figure 1.

5

B. Protéine mature : on l'obtient à partir de l'ADNc décrit ci-dessus après digestion par BstN I (en position 173). Le fragment obtenu et le linker ayant pour séquence :

10

5' 3'  
ATGACCGACCCAGACCCTCTCC  
TACTGGCTGGGTCTGGGAGAGGT  
3' 5'

15

sont ligaturés. Ceci conduit à une modification de la séquence N-terminal de la protéine mature qui passe de TDPDPLQ à MTDPDPLQ.

20

Ce fragment d'ADNc est ensuite digéré par Nhe I (en position 811) pour être ensuite ligaturé avec le plasmide pUC19 préparé comme décrit dans le paragraphe ci-dessus. Le nouveau plasmide ainsi constitué est appelé pRPA-oxo-02 et sa carte est présentée figure 1.

25

#### EXEMPLE 2: Préparation des gènes chimères :

a. Préparation des vecteurs comprenant le promoteur et le terminateur nos :

- exemple double CaMV : on obtient ce vecteur à partir du plasmide pRPA-BL-410 obtenu de la façon suivante:

30

Fusion" peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA":

Le peptide de transit de la PSU du gène de la RuBisCO de maïs provient d'un fragment EcoRI-SphI de 192pb; issu de l'ADNc correspondant au gène de la PSU du gène de la RuBisCO de maïs, décrit par Lebrun et al(1987), possédant un site NcoI recouvrant le codon initiateur de la traduction et un site SphI correspondant au site de clivage du peptide de transit.

Par traitement de l'extrémité SphI avec la polymérase du bactériophage T4 et en la ligaturant avec l'extrémité NcoI, traitée à la polymérase de Klenow, du gène AroA de pRPA-BL 104 recoupé EcoRI, on obtient la fusion traductionnelle entre le peptide de transit de maïs et le gène de l'EPSPS bactérienne.

Fusion peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/séquence de 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs/ gène AroA:

De façon similaire un fragment EcoRI-HindII de 228bp de l'ADNc de la PSU du gène de la RuBisCO de maïs est ligaturé avec l'extrémité NcoI traitée à la polymérase de Klenow du gène AroA de pRPA-BL 104 et recoupé par EcoRI. On obtient une fusion traductionnelle entre le peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs, les 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs et le gène de l'EPSPS bactérienne.

Peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol:

Le fragment est issu de l'ADNc isolé par Waksman et Freyssinet(1987). Un site SphI a été créé

selon la méthode de Zoller et Smith(1984 au site de clivage du peptide de transit. Le peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol ainsi obtenu est un fragment EcoRI-SphI de 171 pb.

5

Fusion peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs/ gène AroA:

La construction contenant la fusion peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs de la partie mature du gène de maïs a été coupée par EcoRI-SphI de 171 pb correspondant au peptide de transit de la PSU dedu gène de la RuBisCO de tournesol. Une construction résultante présente une substitution des fragments EcoRI-SphI et est une fusion traductionnelle "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA.

20

Le fragment EcoRI-SalI a été ligaturé avec le fragment SalI-SstI contenant la séquence nos 3' et la bordure droite de l'ADN-T. Le fragment EcoRI-SstI résultant comprenant "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos 3'/Bordure droite ADN-T" est substitué au fragment EcoRI-SstI contenant la bordure droite de l'ADN-T du plasmide 150 A alpha 2 contenant le promoteur double CaMV. La fusion transcriptionnelle "double CaMV/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos 3' dans le vecteur 150 A alpha 2 a été nommé pRPA-BL 294.

30



Fusion"peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA":

5           La construction ci-dessus est coupée par NcoI-HindIII libérant le gène AroA. Puis elle est mise en ligation avec un fragment NcoI-Hind III de 1,5kpb contenant la fusion"peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA". Une construction résultante  
10 présente une substitution des fragments NcoI-HindIII et est une fusion traductionnelle "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de la partie mature du gène de maïs /peptide de transit de la PSU de la  
15 RuBisCO de maïs/gène AroA".

          Le fragment EcoRI-SalI a été ligaturé avec le fragment SalI-SstI contenant la séquence nos 3' et la bordure droite de l'ADN-T. Le fragment EcoRI-SstI résultant  
20 comprenant"peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de la partie mature du gène de maïs /peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos  
25 3'/Bordure droite ADN-T" est substitué au fragment EcoRI-SstI contenant la bordure droite de l'ADN-T du plasmide 150 A alpha 2 contenant le promoteur double CaMV. La fusion transcriptionnelle "double CaMV/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de  
30 tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de la partie mature du gène de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos 3' dans le

vecteur 150 A alpha 2 a été nommé pRPA-BL 410. Ce plasmide est digéré avec EcoRI et SalI pour enlever le gène de structure "peptide de transit optimisé-zone codant pour l'EPSPS mature", pRPA-BL-410 délété (voir figure 1).

- exemple PSUHa : on obtient ce vecteur à partir du plasmide pRPA-BL-207 (décrit dans la demande de brevet européenne 0 337 899) que l'on digère avec Eco RI et Hind III pour enlever la zone codant pour la nitrilase, pRPA-BL-207 délété (voir figure 1).

b. Construction des gènes chimères :

pRPA-oxo-03 : il s'obtient en digérant pRPA-oxo-01 par Eco RI et Sal I. Le fragment obtenu qui code pour la préprotéine est ensuite inséré entre les sites Eco RI et Sal I respectivement en aval du double CaMV et en amont du terminateur nos.

pRPA-oxo-04 : il s'obtient en digérant pRPA-oxo-02 par Eco RI et Sal I. Le fragment obtenu qui code pour la protéine mature est ensuite inséré entre les sites Eco RI et Sal I respectivement en aval du double CaMV et en amont du terminateur nos.

pRPA-oxo-05 : il s'obtient en digérant pRPA-oxo-01 par Eco RI et Hind III. Le fragment obtenu qui code pour la préprotéine est ensuite inséré entre les sites Eco RI et Hind III respectivement en aval du double PSUHa et en amont du terminateur nos.

5 pRPA-oxo-06 : il s'obtient en digérant pRPA-oxo-02 par Eco RI et Hind III. Le fragment obtenu qui code pour la protéine mature est ensuite inséré entre les sites Eco RI et Hind III respectivement en aval du promoteur PSUHa et du terminateur nos.

Tableau 1 : Représentation schématique des quatre gènes chimères :

10				
	Identification	Promoteur	Zone codante	Termineur
			oxalate oxydase	
	pRPA-oxo-03	dCaMV	préprotéine	nos
	pRPA-oxo-04	dCaMV	mature	nos
15	pRPA-oxo-05	PSUHa	préprotéine	nos
	pRPA-oxo-06	PSUHa	mature	nos

### EXEMPLE 3: Obtention de colzas transgéniques:

#### a. Transformation

20 Chaque vecteur tel que décrit ci-dessus est introduit dans la souche non-oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 (Hood et al., 1987) porteuse du cosmide pTVK 291 (Komari et al., 1986).

25 La technique de transformation du colza variété Westar suit essentiellement celle décrite par Boulter et al. (1990), en utilisant une concentration en bactéries de  $2,5 \times 10^9$  par ml (DO 600nm = 1).

30

#### b. Régénération

La technique de régénération suit essentiellement celle décrite par Boulter et al. (1990). Les plantes sont enracinées sur le milieu

de De Block et al. (1989). Elles sont ensuite conduite à floraison en serre.

EXEMPLE 4: Mesure de la résistance du Colza à

Sclerotinia sclerotiorum:

In vitro :

- Disques foliaires : la résistance est mesurée par pesée de la masse de trois disques foliaires au bout de 11 jours de croissance sur un milieu Murashige et Skoog(MS) avec hormones additionné de 1 mM d'acide oxalique.

Dans ces conditions, on observe que pour les disques foliaires issus de Colzas modifiés avec l'un des gènes chimères pRPA-oxo-03, pRPA-oxo-04, pRPA-oxo-05 et pRPA-oxo-06, la masse des disques foliaires augmente nettement, alors que, pour les disques foliaires issus de colzas non modifiés, la masse stagne ou même diminue.

- Elongation racinaire : la résistance est aussi mesurée in vitro par mesure de l'élongation racinaire au bout de deux jours de croissance sur eau additionnée de 5 mM d'acide oxalique. On observe alors que les racines de plantes de Colzas modifiés, avec l'un des gènes chimères pRPA-oxo-03, pRPA-oxo-04, sont capables de pousser et de s'allonger, alors que les racines de Colzas non modifiés ne présentent, dans ces conditions, aucune croissance.

In vivo :

La résistance in vivo est mesurée en serre après contamination des plantes de Colza issues de la régénération, dès l'apparition des premières fleurs, soit par dépôt de spores de S. sclerotiorum

sur les pétales, l'infection des feuilles se faisant alors naturellement lors de la défloraison, soit par dépôt directement sur les feuilles de mycelium ou d'un pétale imprégné de mycelium. Les plantes modifiées par l'un des gènes chimères pRPA-oxo-03, pRPA-oxo-04, pRPA-oxo-05, et pRPA-oxo-06 ne  
5 laissent pas se développer le champignon et ne présentent aucun symptôme de pourriture caractéristique de la sclérotiniose, alors que des plantes non modifiées sont vite envahies de pourriture caractéristique du développement de Sclerotinia sclerotiorum.

10

Légende de la Figure :

Procédure d'obtention des quatre gènes chimères à partir des deux gènes de structure, pRPA-oxo-01 et pRPA-oxo-02 H, Hind III ; B, BstN ; N, Nhe I ; E,  
15 Eco RI ; Sc, Sac I ; S, Sal I et X, Xba I.

REVENDICATIONS

- 5           1) Séquence ADN codant pour une oxalate oxydase.
- 2) Protéine oxalate oxydase utilisable pour la résistance des plantes aux  
            maladies provoquées par Sclerotinia sp.
- 10          3) Gène chimère caractérisé en ce qu'il comprend comme séquence codante un  
            ADN selon la revendication 1.
- 4) Vecteur pour la transformation des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend  
            un gène chimère selon la revendication 3.
- 15          5) Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un vecteur  
            selon la revendication 4.
- 6) Plante transformée issue d'une cellule selon la revendication 5.
- 20          7) Plante selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est une  
            dicotylédone.
- 8) Plante selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est du Colza.
- 25

## REVENDICATIONS MODIFIEES

[reques par le Bureau International le 10 juillet 1992 (10.07.92);  
revendication 1 modifiée;  
autres revendications inchangées (1 page)]

- 1) Séquence ADN codant pour une oxalate oxydase  
5 utilisable par la résistance des plantes aux maladies  
provoquées par Sclerotinia sp.
- 2) Protéine oxalate utilisable pour la résistance des  
plantes aux maladies provoquées par Sclerotinia sp.  
10
- 3) Gène chimère caractérisé en ce qu'il comprend comme  
séquence codante un ADN selon la revendication 1.
- 4) Vecteur pour la transformation des plantes,  
15 caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon  
la revendication 3.
- 5) Cellule végétale transformée, caractérisée en ce  
qu'elle contient un vecteur selon la revendication 4.  
20
- 6) Plante transformée issue d'une cellule selon la  
revendication 5.
- 7) Plante selon la revendication 6, caractérisée en ce  
25 qu'elle est une dicotylédone.
- 8) Plante selon la revendication 7, caractérisée en ce  
qu'elle est du Colza.

1/1

## ADNc de l'oxalate oxydase

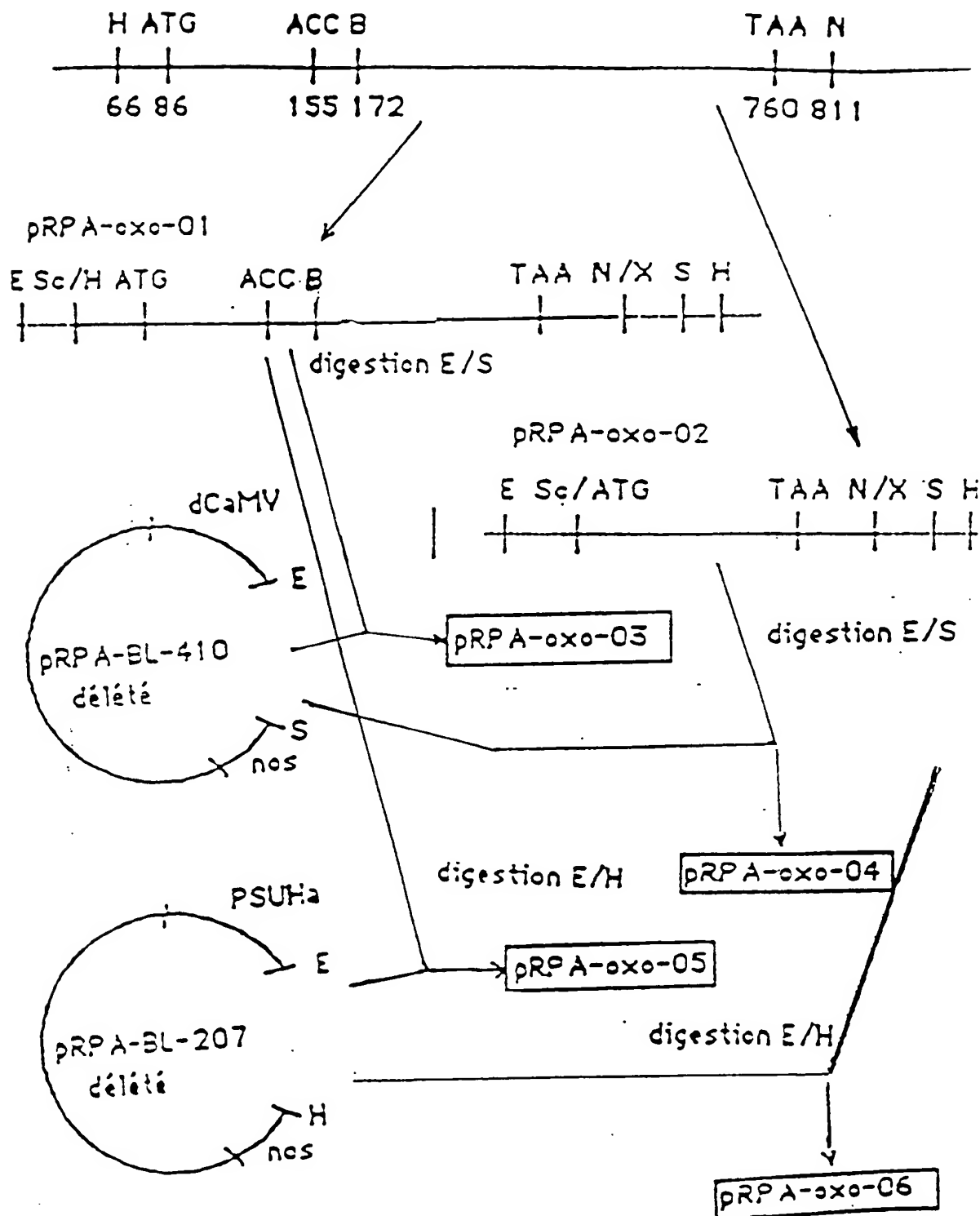


Fig 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 92/00195

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. <sup>5</sup>	C12N15/53; C12N9/02; C12N15/82; C12N5/10; A01H5/00; //A01N63/00	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. <sup>5</sup>	C12N; A01N; A01H	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	J. BIOL. CHEM. vol. 264, No. 9, 25 March 1989, pages 4896 - 4900; DRATEWKA-KOS E., ET. AL.: 'Polypeptide structure of germin as deduced from cDNA sequencing' see the whole document	1-3
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS; vol. 98, 1983, Columbus, Ohio, US; abstract No. 13533, & PREP. BIOCHEM. V.12, No. 4, PP. 341-353: PIETTA, P. G., ET.AL.: 'Improved purification protocol for oxalate oxidase from barley roots' see abstract	2
X	--- AGRIC. BIOL. CHEM. vol. 52, No.3, 1988, pages 743 - 748; KOYAMA H: 'Purification and characterization of oxalate oxidase from Pseudomonas sp. OX-53' see the whole document	2
Y	--- -/-	1,3
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
22 May 1992 (22.05.92)	11 June 1992 (11.06.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	WO, A, 8 808 450 (FINLAYSON) 3 November 1988 see page 17 - page 22 see page 67 - page 68; claim 8 -----	1,3

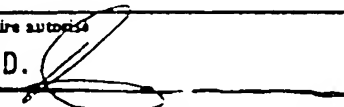
FR 9200195  
SA 58049

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 22/05/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8808450	03-11-88	None	

03/01/2008

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>1</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/53; A01H5/00;	C12N9/02; //A01N63/00	C12N15/82; C12N5/10
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; A01N ; A01H	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>9</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	J. BIOL. CHEM. vol. 264, no. 9, 25 Mars 1989, pages 4896 - 4900; DRATEWKA-KOS E., ET. AL.: 'Polypeptide structure of germin as deduced from cDNA sequencing' voir le document en entier ---	1-3
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, 1983, Columbus, Ohio, US; abstract no. 13533, & PREP. BIOCHEM. V.12, NO. 4, PP. 341-353; PIETTA, P. G., ET. AL: 'Improved purification protocol for oxalate oxidase from barley roots' voir abrégé --- -/-	2
<p><sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
1 22 MAI 1992	11. 05. 92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	MADDOX A.D. 	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>16</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
X	AGRIC. BIOL. CHEM. vol. 52, no. 3, 1988, pages 743 - 748; KOYAMA H: 'Purification and characterization of oxalate oxidase from Pseudomonas sp. OX-53'	2
Y	voir le document en entier ---	1,3
Y	WD,A,8 808 450 (FINLAYSON) 3 Novembre 1988 voir page 17 - page 22 voir page 67 - page 68; revendication 8 ---	1,3

FR 9200195  
SA 58049

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 22/05/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8808450	03-11-88	Aucun	

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

**This Page Blank (uspto)**